

## ⑫ 公表特許公報(A)

平4-506078

⑬ 公表 平成4年(1992)10月22日

⑭ Int.Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

A 61 K 49/00  
49/04C  
J 8415-4C  
8415-4C

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 経皮のリンパ管造影

⑯ 特 願 平2-509813

⑰ 出 願 平2(1990)5月30日

⑱ 翻訳文提出日 平3(1991)11月29日

⑲ 国際出願 PCT/US90/02984

⑳ 国際公開番号 WO90/14846

㉑ 国際公開日 平2(1990)12月13日

優先権主張 ㉒ 1989年5月30日 ㉓ 米国(US) ㉔ 358,678

㉕ 発 明 者 ウルフ, ジェラルド・エル

アメリカ合衆国, 08190 マサチューセッツ州、ウインチエスタ  
一、ホーゾン・ロード、5㉖ 出 願 人 アライアンス・ファーマスーテ  
イカル・コーポレイションアメリカ合衆国, 92121 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、サ  
イエンス・パーク・ロード、3040

㉗ 代 理 人 弁理士 深見 久郎 外4名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域  
特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広  
域特許)

最終頁に続く

## 請求の範囲

1. 微粒子またはコロイド形状の非放射性造影剤を組成する組成物であって、造影剤が集中したリンパ系組織の造影を可能にして経皮リンパ管造影を行なうため、造影剤が間質的に投与された部位に輸入性のリンパ系組織に集中することが可能な造影剤の調製において、粒子の平均サイズが直径で5から900ナノメートルである、組成物。
2. 少なくとも80%(容量で)の前記粒子は直径で10と500ナノメートルとの間である、請求項1に記載の組成物。
3. 少なくとも20%の粒子は直径で200ナノメートルまたはそれ以下である、請求項1に記載の組成物。
4. 粒子は超常磁性もしくは強磁性であり、または不溶性金属コロイド、脂質水溶性ヨウ化された化合物または造影可能なフルオロカーボンを含む、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。
5. 造影剤は一臭化ベルフルオロカーボンのような臭化されたベルフルオロカーボンである、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。
6. 造影剤はベルフルオロ臭化オクチルである、請求項1ないし3および5のいずれかに記載の組成物。
7. 造影剤は一、二または三ヨウ化ベルフルオロカーボンである、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。

8. 粒子の平均サイズは300nmより小さい、請求項1ないし7のいずれかに記載の組成物。

9. 粒子は造影可能な成分と造影可能な成分を組み込む適当にサイズ決めされた微粒子恒体とを含む、請求項1に記載の組成物。

10. 組成物は造影剤が間質的に投与された部位に輸入性のリンパ系システム組織に集中するように適合されて造影剤が集中したリンパ系組織の造影を可能にするように経皮リンパ管造影を行なう、請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物の用途。

11. 造影はMRI、超音波、X線、デジタルサブトラクション法またはコンピューター断層撮影法によって行なわれる、請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物の用途。

12. 間質投与の部位は手、足、または肢を含み、腋窩、膝窩または舌の節の造影を許容する、請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物の用途。

13. フルオロカーボン乳剤の調製のためのプロセスであって、

水性相を有しかつフルオロカーボン相を有する水性乳剤を形成するステップと、さらに

水性相の少なくとも幾分かを除去して過析、限外濾過または逆浸透によって乳剤を濃縮するステップとを含む、プロセス。

14. フルオロカーボン相は150ナノメートルより小さい平均粒子サイズを有する、請求項13に記載のプロセス。
15. 前記濃縮するステップは透析、限外濾過または逆浸透を含む、請求項13に記載のプロセス。
16. 少なくとも20容量パーセントの前記フルオロカーボン相は300ナノメートルより小さい粒子サイズを有する、請求項13に記載のプロセス。
17. 5ナノメートルと900ナノメートルとの間の平均粒子サイズを有する造影可能な微粒子物質の間接リンパ管造影を行なうために哺乳類への間質投与のための造影剤として使用する薬物の調製における用途。
18. 間接リンパ管造影を行なうために哺乳類に間質的に投与するための造影剤として使用するための薬剤的組成物の形状にある請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物であって、  
注射に適切な薬剤的に受入れ可能な担体中で5ナノメートルと900ナノメートルとの間の平均粒子サイズを有し、かつ前記組成物の投与部位に輸入性のリンパ系組織に集中するように適合された微粒子またはコロイド形状の造影可能な非放射性造影剤によって特徴づけられる、組成物。
19. 間接リンパ管造影のための造影剤として前記微粒子物質の間質投与に対する政府の承認を表わす印を付けた前記微粒子物質に関連した包装材料をさらに含む、請求項

#### 明 細 書 経皮のリンパ管造影

##### 発明の背景

この発明は人間を含む哺乳類のリンパ節を造影するための方法および組成物に関する。

局所または遠隔のリンパ節への癌の広がりや予後および治療を変化させる。したがって、一患者で癌の段階を正しく決定するには癌に始まるリンパ管に沿うリンパ節の評価が必要である。リンパ節の造影はここではリンパ管造影と呼ばれ、効果的なリンパ管造影は節が確実に識別され、そのサイズが測定されかつ節内解剖学的構造または機能が表示されることを要求する。(ここに開示される特定の技術はまた「リンパ節造影」とも適切に呼ばれ得る。)リンパ系への造影剤の直接注入なしでの造影は間接リンパ管造影と呼ばれる。

リンパ節に宿って成長する癌細胞は節拡大によって、変化したふるい分け機能によってまたは変化した食作用によって識別され得る。正常なリンパ節は1から15mmのサイズの範囲にあり、かつ過栄養または過形成によって拡大されることが可能である。癌評価のための基準としてのサイズは、節が非常に大きくなければかつ患者が癌であることを知らなければ小さい。造影装置の中にはリンパ節のサイズを見るための適当な空間解像度を有するものもあるが、リンパ節と類似の形状を持つ他の生物学的構造とを確実に区別するための組織識別に欠けている。これらの造影様式は

18に記載の組成物。

20. 間接リンパ管造影を行なうための方法であって、  
微粒子またはコロイド形状の非放射性造影剤を哺乳類に間質的に投与するステップを含み、前記造影剤は直接で約5から約900ナノメートルの平均粒子サイズを有し、さらに

造影剤が注射部位に輸入性のリンパ系組織に集中することとを可能にするステップと、さらに

前記造影剤が前記投与の約1カ月以内に集中したリンパ系組織を造影するステップとを含む、方法。

X線、コンピュータ断層撮影、磁気共鳴造影および超音波を含む。ラジオアイソトープ造影は要求される空間解像度を有しない。

いずれの現在の造影方法体系も造影剤なしでは節内構造を識別することは可能ではない。体内の非常に僅かな数のリンパ管、通常は下肢のリンパ管は外科的処置で分離するに足る十分な大きさがあり、これらのリンパ管はそのリンパ節に運ばれる造影剤を注射されることが可能である。

したがって、リンパ節を造影するための今日の従来技術は造影剤のリンパ管への直接注入を利用する。リンパ管造影として知られるこの処置において、放射線専門医は大きなリンパ管に直接カニューレを挿入し、そこに注射されたリンパ管を排出するリンパ節の洞線毛細血管を凝結する一般に油性のヨウ化剤である造影剤を注射する。残念ながら、リンパ管造影は限られた用途でしか用いられず、一般に満足な結果を与えない。このプロセスはリンパ管の外科的露出および識別を要求する。これは技術的に困難であるが、足のリンパ管のために確立された処置方法である。注射および処置時間は2ないし3時間で、撮影は普通24時間後に行なわれる。さらに、注射された溶液はごく僅かの足、骨盤および腹部の節しか造影しない傾向にある。胸部および頸部のいずれかのリンパ節の造影を得ることは、肺癌および乳癌の評価および治療の際にこれらの節を造影することが非常に重要であるにもかかわらず、一般的ではない。

リンパ管造影において、造影剤は洞様毛細血管内の流体静力学的力によって取除くことができない粘着性の閉塞を作り出すことによってリンパ節洞の中に宿るようである。もしリンパ節が初めに癌細胞によって完全に閉塞されるかまたは部分的閉塞が側副の管を作り出していけば、異常な節は可視化されずかつ色素は呼吸の気体交換に対する副作用で肺を塞栓するであろう血流に結果として到達し得る。リンパ管造影の主要な欠点は費用がかかり、技術を要求しかつ反復可能性を制限する上にさらに何らかの病的状態をもたらす直接切開が要求されるという事実を含む。さらに、リンパ管ドレナージ床およびその関連リンパ節の大多数は接近が困難であり、それらの中に乳房、精巣、前立腺、頭、子宮、腎臓、肝臓、腸および肺などの癌の一般的な目標物がある。

手術を含む長びく処置に伴う危険に加えて、処置で使われる造影剤に特に関連するリンパ管造影に伴う他の危険性がある。もし選ばれた造影剤が水溶性であるかまたは非常に小さい粒子サイズを有すれば、それはリンパ管から拡散してあまりに容易にリンパ節を通過し得る。現在X線リンパ管造影はリンパ系への直接注射のために乳化されたけし種子油脂肪酸のエチルエステルのヨウ化オイルを利用する。この物質は大きな粒子サイズを有し、粘性が高く、ぎりぎりの毒性を有し、かつリンパ節を塞栓する。検出され

ない直接リンパ管静脈接続がある場合には、けし種子油脂肪酸のエチルエステルのヨウ化オイルは体循環に指向され、痛みを伴いつつ潜在的に致死の結果となり得るであろう。

ヨウ素製剤を使った間接リンパ管造影は通常は不可能であることが明らかにされており（ミュッツェル（Mutzell）米国特許第4,367,216号：ハウエイ（Hoey）、米国特許第4,225,725；フェルダ（Felder）、他、スイス特許第615,344号）、かつヨウ素乳剤もまた毒性がある（ミュッツェル）。他方、日本特許公告42-25413は腹腔内注射で成功したヨウ化された植物脂肪油の開発をクレームした。そのクレームを実証するための詳細は与えられていないし、何の毒性データも間接リンパ管造影のために与えられずかつ1965年9月28日の出願日以来他の肯定的な実験についての何の報告もない。スイス特許615,344は1,000-5,000nmの粒子サイズを持つ結晶ヨウ素製剤を開示する。それらは胸骨下のリンパ管およびリンパ節は腹腔内注射後規則正しく可視化できることをクレームする。これは成功に関してもこの注射経路からクレームされた特定の節に関しても疑わしい、その理由は特に腹腔腔からの胸骨から下方向へのリンパの流れはないからである。

他のヨウ素を含む乳剤がリンパ管造影のために提案されてきたが、その目的のために採用はされなかった。たとえばスイス特許第615,344号および日本公告出願第25413/67号を見られたい。毒性問題は一主要関心事である。また1

0.0ナノメートルおよびそれ以上の粒子サイズは間接リンパ管造影には適さない（腹腔内注射の可能性を除く）。腹膜は大きな表面および大抵の薬の容易な吸収を提供する。腹膜のリンパ管はより通水性であり、特に取込みが呼吸運動によって容易にされる横隔膜のリンパ管はそうである。残念ながら、この経路で接近可能なリンパ節はほとんどなく、臨床的な興味は小さい。さらに、血管空間への直接接近は胸部管によって容易にされるので、腹腔内経路はリンパ管造影剤の毒性に特別の制限を設ける。

多くの研究者達はリンパ管造影のための造影剤として放射線標識された物質を使って実験を行なった。放射性に標識した造影剤の開発に関しては比較的豊富な文献がある。研究によればリンパ管の取込みおよび血管排除は約40nmの粒子にとって最適である（たとえばベルグキスト（Bergquist）、他の「間隙性リンパシンチグラフィ造影剤の粒子サイズ決めおよび生物動力学（Particle sizing and biokinetics of interstitial lymphoscintigraphic agents）」、*Sen. Nucl. Med.* 13:頁9-19, 1983年を見られたい。）これらの以前の研究者達はまた動物モデル、薬物動力学およびさらに人間の研究についてのよい情報も提供してきた。（エイゲ（Ege）、G. N. の「乳癌の治療におけるリンパシンチグラフィ法および応用（Lymphoscintigraphy techniques and applications in the management of breast carcinoma）」、*Sen. Nucl. Med.* 13:頁26-41, 1983年をもま

た見られたい）。残念ながら、リンパ節に取込まれた放射性アイソトープは僅かな空間解像度を与え、かつ節のサイズまたは節内構造についての詳細を決定することを非常に困難にする。

Au<sup>198</sup> およびGa<sup>67</sup>はそれぞれリンパ節および腫瘍に対する何らかの結合力を有する。（たとえば、リンパ管造影：リンパ管造影法、コンピュータ断層撮影法およびシンチグラフィ、第2版、M. クローズ（Close）およびS. ウォリス（Wallis）、編集、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンズ社（Williams and Wilkins Co.）、バルチモア（Baltimore）、1985年を見られたい）。前者は造影するにはあまりにエネルギーをもちすぎ、かつ局所的な組織損傷を引き起こす。後者は興味深い、静脈内の用途にのみ使用可能であり、かつリンパ節のステージングには適さない。最近、蛋白質特異的試薬が治療目的のために提案された。（たとえばウエインステイン（Weinstein）、他の「転移の診断および治療に向けてのリンパ管における単一クローン抗体（Monoclonal antibodies in the lymphatics: toward the diagnosis and therapy of metastases）」、*Science* 218:頁1334-1337, 1982年を見られたい）。しかしながら、当座はアイソトープ造影装置の空間解像度はリンパ節内の標識した材料の選択的分布の利用を排除する。

一般に、溶性でかつアルブミンのような比較的小さな分子（<5nm）は間質空間からリンパよりも血液に吸収さ

れるかまたは、それらはリンパ節によって十分保持されないもので、節内構造を造影するために効果がないかのどちらかである。

我々はより大きい分子を粒子であると考え、1ミクロンまでの粒子はコロイドと呼ばれる一方で、1ミクロン以上では粒子は懸濁物と呼ばれる。小集塊のアルブミンは前者のカテゴリーである一方で、大集塊のアルブミンは後者である。放射線標識されたコロイドは、現在のカメラの低い空間解像度にもかかわらず、間接リンパ管造影にとって非常に利益があった、しかしながら、候補造影剤のサイズを測定するための方法は十分なものではない。ベルグキスト他 (Sci. Med., 1983; 13:9) は放射性コロイド粒子サイズを測定するための9種類の技術を列挙した。いずれもが完全に満足のいくものではないし、多くのコロイド調製物はまた広い範囲の粒子サイズを有する。特定の調整における二項分布は平均サイズを測定する方法を無効にするであろう。大半の調製物は完全な分布またはヒストグラムによってよりよく特徴づけられる。

もし粒子が固ければ、サイズ決めはより容易である。しかしもし粒子が変形可能であれば、サイズ決めはより困難である。大半の方法はサイズを生体外で測定するが、サイズは生体内で増加または減少し得る (ベルグキスト)。コロイド粒子は通常は投与の前に安定剤で被覆され、かつ生体内でまた被覆 (オプソニン作用) される。効果的な粒子

サイズは被覆と芯を含むので、これは測定を複雑にする。造影用途のために、活性造影剤は通常は芯物質に限定される。

粒子はリンパ管内皮細胞の間のギャップを通してまたは細胞間エンドーエキソサイトーシスによって間質からリンパ管に侵入する。ギャップは生理学的または病理学的条件で内径が変化する。粒子のギャップへの侵入はいきあたりばったりの出来事であると考えられ、かつギャップのサイズより小さいサイズにある粒子サイズにあまり関連しないはずである。平均的に、より小さい粒子 (10-50 nm) はより大きい粒子より多く侵入しそうである。しかしながら、大きい粒子は通常より多くの造影可能な物質を選び、かつ造影強度を変える際に一粒子についてより効果的である。したがって、特定の製剤に対する造影効果を予測することは複雑である。粒子が1000 nmに近づくとき、それらのリンパ管への取込みは非常に少ないので、それらは効果がなくなる。間質空間における非常に大きな粒子は食細胞によって運び去られるかまたは局所のプロセスによってサイズを低減されなければならない。

一旦粒子がリンパ管空間に到達すると、たとえそれらが2、3000ナノメートルもの大きさがあるとしても、機能的リンパ節はそれらを非常に効果的に除去することが可能である。このプロセスは粒子被覆、粘着および食作用を要求する。リンパ節の癌沈積物はリンパ節洞様毛細血管を

破壊し、かつ癌細胞はほとんどまたは全く食作用能力を有しない。これら双方の理由のために、癌性領域は粒子をあまり蓄積しない。

事実上すべての粒子—そのリストは長くかつ様々なものであるが—はそれらが運ばれるリンパから節の正常な部分を選択的に目標とする。「病気の食細胞」のリンパ節内で分離している粒子への影響は未知であるが、過形成または過栄養を引起する大半のプロセスは機能食細胞を作り出し、かつこれらの節は大きいけれども粒子を蓄積する。

エチオドール (Ethiodol) —標準的なリンパ管造影剤—は十分食作用されず、かつ洞様毛細血管の遮断によって作用する。このことは中くらいの倍率で正常の節に粒状の外観を作り出す点に分布を説明する。リンパ節における胚の小胞は洞様毛細血管およびまた機能的マクロファージをほとんど有さない。エチオドールおよび粒子の双方はこれらの領域で希薄に蓄積されるであろう。

他の細胞、通常は癌細胞によって全体的にとって代わられるリンパ節は、リンパを何も摂取しないであろうが、血液は摂取し続ける。直接リンパ管造影も間接リンパ管造影もこの環境で節内構造を規定するには効果的ではないであろう。しかし尿管内造影剤を使ってかかる節を目標とすることは依然として可能であり得る。

明らかに、ストランド (Strand) 他 (J. Nucl. Med., 1979; 20:1038) のエレガントに区画に分かれたモデルにもかか

わらず、間接リンパ管造影剤を評価するためのほとんどの試みは実際の動物実験に重く依存している。ミクヒープ (Mikheev) (アトミック・エネルギー・レビュー (Atomic Energy Review) 1976; 14:1) はこう書いている、「コロイド粒子サイズの測定は非常に困難さを表わし、かつ体内のコロイド溶液の行動は粒子サイズに間接的にのみ関連しているので、実験動物での生物学的研究によってコロイド溶液を制御することの方がより役立つ。」他方、サイズ分布および造影効力法が利用可能でありかつ正確であれば、生体外で提案された造影剤を遮断することはずっと容易であろう。かかるデータは動物研究に対する負担を大幅に低減し、かつ研究者がこの複雑な生物学プロセスをさらに理解する際に助けとなり得る異常な反応を識別することを可能にするであろう。

腹膜もしくは胸膜空間の中にまたは肺実質の中に皮下に放射線不透過性のベルフルオロカーボンを注射することによる間接リンパ管造影で少なくとも1つの報告された試みがある。しかしながら、ニートでかつ乳化された放射線不透過性のベルフルオロカーボンの双方を注射することを含む動物実験は臨床的に役立つ情報を生み出せなかった。D: ロング (Long)、他のラジオロジー (Radiology) 133:頁 71-76 (1979年) を見られたい。その代わりとして、リンパ節の乳剤との放射性混濁化は散発性であり、かつベルフルオロカーボンの投与の8カ月後に1体の動物でのみ観察

された。この結果は臨床応用にはあまりに不足でありかつあまりに時間がかかり過ぎる。

直接または間接リンパ管造影を行なうための他の試みはヨウ化水溶性造影剤の二量体を利用するものであった。二量体は分子サイズを増大し、かつリンパ管からの拡散をある程度低減するが、しかしながらこれらの小さな溶性造影剤はリンパ節の一過性の混濁化を与えるに過ぎないようである。

したがって、リンパ管造影法と妥当な時間期間内に体のいずれかの所望の部位にあるリンパ節の造影を許容する造影剤への要求がある。かかる造影は興味ある領域的リンパ節の場所、サイズおよび内部構造を識別し、かつ一方で正常な節成分の過栄養および過形成によるリンパ節拡大と、他方で腫瘍形成との間の区別を可能にするであろう。

さらに、処置時間と患者の不快を最小限にする一方で、処置の危険性を低減するリンパ管造影処置への要求がある。

これらのおよび他の目的はこの発明によって達成される。

#### 発明の概要

この発明はリンパ管への取込みと領域的リンパ節における保持とを容易にする特定の特徴を有する造影剤を利用する。様々な種類の造影剤が使用され得るが、我々はそれらが1つの共通のパラメータ、つまり適切な粒子サイズを有しなければならないことを発見した。

リンパ節は輸入性リンパ管によって運搬された物質を処

理し、運搬された物質は流体、微粒子および細胞である。リンパ節はふるい分けまたは食作用によって物質を除去する。非細胞物質はリンパ管内皮の細胞の間のギャップを通しておよびエンドサイトーシスによって間質性流体からリンパ管へ侵入する。ギャップは解剖学的意味では固定されていないので、いずれの所与のギャップでも間欠的に開閉可能である。間質流体または組織の運動の増強はギャップをより広くまたはより頻繁にあげる傾向にあり、侵入する物質の量およびサイズを増大する。

間質空間内の直径で5 nmまでの流体および粒子はリンパ系によって優先的に摂取されないが、その代わり血液循環によってより急速に吸収される。他方、5 nmより大きい粒子は毛細血管によって十分吸収されない。粒子のサイズが900 nm、1000 nmおよびそれ以上に達すると、粒子はほんの僅かしかリンパ系に貫通しないと予測される。したがって、5または10 nmと500または900 nmとの間の粒子が最もリンパ系によって優先的に摂取されかつリンパ節で保持されそうであると我々が認めた粒子である。

したがって、要するに、この発明は1以上の造影法による造影に適切な造影剤に向けられ、その造影剤は粒子またはコロイドの形状であり、かつ経皮のまたは間質の投与に基づいてリンパ系によって優先的に摂取されるように適合される。これらの造影剤は放射線不透過性物質、MRI造

影剤、超音波造影剤および動物の体を造影する装置に適切な他のいかなる造影剤でもあり得る。それらは好ましくは毒性がなく、かつ最小で5または10 nmと最大で500または900 nmとの間の平均粒子サイズを有するべきである。もちろん、いかなる所与の微粒子系においても、粒子サイズは通常は分布を形成する。したがって、平均粒子サイズは5ないし900 nmの範囲にあり、好ましくは10ないし500または800 nmの範囲にあることが好まれる。代替的に、容量で粒子の少なくとも80%は5または10 nmないし800または900 nmの範囲にあることが所望される。好ましい実施例において、平均または中間の粒子サイズは少なくとも20 nmでありかつ有利には500 nmより小さくてもよい。平均粒子サイズが僅か300または250 nmでさえある製剤もまた、150 nmより小さい平均粒子サイズを有する製剤と同様考えられる。また我々は容量で粒子の少なくとも20%が300 nmまたは200 nmより小さい製剤に特定の有利さがあると考ええる。

粒子の特定の型は広い範囲の可能性から選択され得る。適当なサイズのポリマーが使用され得る。コロイドもまた適当な粒子サイズを有する乳剤と同様この発明の範囲内である。

この発明の一実施例において、乳剤の粒子の平均サイズは250 nmより小さい。乳剤小滴は界面活性剤のような乳

化造影剤で好ましくは安定化される。特に有利であるのはリン脂質界面活性剤であり、これは生物相溶性、リンパ管による取込みおよび全面的な流動学的特性に固有に影響を及ぼし得る。適当なサイズはまた造影剤を運ぶ小さなリポソームを用いて入手され得る。最終的に、製剤の粘性は非常に大きいと考えられる。我々のデータによれば、大きな粒子サイズおよび粘性のある組成物はリンパ系に容易にかつ急速に侵入しない。したがって、我々は、 $11.5 \text{ sec}^{-1}$ のずり速度で25℃において測定された50 cps以下、好ましくは僅か35または40 cpsおよび最も好ましくは20または25 cps以下の粘性を有する組成物を好む。我々は10 cps以下のおよび特に5 cps以下の粘性を有する乳剤を使ってよい結果を得た。

付加的な変形において、好ましい組成物はまた微粒子またはコロイド形状の非放射性造影剤を含み、平均粒子サイズは直径で10ないし900 nmであり、組成物は部位に輸入性のリンパ系組織に集中するように適合され、この部位において造影剤は間質的に投与され、造影剤が集中したリンパ系組織の造影ができるように経皮のリンパ管造影を行なう。付加的な実施例は粒子が造影可能な成分と造影可能な成分を組込む適当にサイズ決めされた微粒子担体とを含む組成物を開示する。

間接リンパ管造影のために哺乳類に間質的に投与するための造影剤として使用するための製剤の組成物であって、

5ナノメートルと900ナノメートルとの間の平均粒子サイズを有する微粒子またはコロイド形状の造影可能な非放射性造影剤によって特徴づけられ、注射に適切な製剤的に受入れられる担体で、かつ組成物の投与の部位に輸入性のリンパ系組織の中に集中するように適合される製剤的組成物もまた開示される。他の実施例において、組成物はさらに間接リンパ管造影のための造影剤として微粒子物質を間質投与するための政府の承認を反映する印を付けた微粒子物質に関連した包装材料をさらに含む得る。さらに他の実施例において、粒子の少なくとも20%は直径で200ナノメートル以下である一方で、付加的な変形において、粒子は超常磁性もしくは強磁性であるか、または不溶性の金属コロイド、脂質溶性ヨウ化化合物または造影可能なフルオロカーボンを含む。この発明はさらに開示された造影剤の用途を含み、造影剤は一臭化ベルフルオロカーボンのような臭化されたベルフルオロカーボンである。他の実施例において、造影剤はベルフルオロ臭化オクチルである。付加的な実施例は造影剤が一、二、または三ヨウ化ベルフルオロカーボンであることを示す。さらに他の変形において、粒子の平均サイズは300nmより小さい。

間接リンパ管造影を行なうために間質投与用の造影剤として使用するための薬物を調整する際の5ナノメートルと900ナノメートルとの間の平均粒子サイズを有する造影可能な微粒子物質の用途もまたここで開示される。用途の

に輸入性のリンパ系組織に集中することを許容するステップと、さらに造影剤が投与の約1カ月以内に集中したリンパ系組織を造影するステップとを含む。

この発明はまた乳剤を調製するための方法を開示し、かつさらに透析、限外濾過法および逆浸透を含むかかる乳剤を濃縮するための方法を開示する。

好ましい造影剤は、ベルフルオロ臭化オクチル（「PFOB」）および他の放射性不透過性ベルフルオロカーボンの乳剤、造影可能なフルオロカーボン化合物、ベルフルオロアルキル化されたエーテルおよびベルフルオロアルキル化されたエーテル臭化物、並びに金、鉄、クロム、ガドリニウム、イットリウム、ジルコニウム、ハフニウム、錫またはアンチモンのコロイドまたは粒子、さらには酸化物、リン酸塩、硫化物または硫酸塩を含む。クロニウム、ガドリニウム、鉄、マンガン、フェライトおよび磁鉄鉱の常磁性、超常磁性および強磁性粒子もまた、デキストラン、アルブミン、ラテックス、ポリスチレンまたは適当なサイズの他の粒子物質に連結されたまたは組込まれた造影可能な化合物と同様に考えられる。

他の化合物もまたこの発明によって考えられ、その中には磁性ポリマー粒子、有機磁性粒子、マイクロ球ならびにオーエン（Owen）への米国特許第4,195,691号、およびそこに述べられた特許引例で論じられるような生物学的に活性な磁性粒子が含まれる。粒子、コロイドまたは乳剤は生体

他の例は、たとえば間質投与の部位が腋窩の、膝窩のまたは舌の節の造影を許容するために手、足または肢を含む他の用途が開示される。代替的に、間質投与の部位は腋窩または頸の節を造影するために胸または顔であってもよい。

X線およびコンピュータ断層撮影造影のために、造影剤はこれらの技術を使って可視化されるように適当な電子密度を有しなければならない。適当な電子密度は、たとえば臭素またはヨウ素成分との化合物において、および放射線不透過性の金属原子を含むまたは有する物質において達成される。

MRIについて、人は造影される組織の対応する特性とは異なる造影のための適当な核または緩和特性を有する物質に頼っている。造影可能な核（たとえば $^{19}\text{F}$ ）または強磁性もしくは常磁性物質のどちらかが適切なMRI装置とともに使用され得る。

デジタルサブトラクション法の使用を含む超音波およびX線造影はまたこの発明の他の実施例に従って利用され得る。超音波造影剤は密度または聴覚特性に基づいて選択され得る。

この発明の一実施例において、間接リンパ管造影を行なうための方法が開示され、この方法は微粒子またはコロイド形状の非放射性造影剤を哺乳類に間質的に投与するステップを含み、その造影剤は直径で約5から約900ナノメートルの平均粒子サイズを有し、さらに造影剤が注射部位

内でのサイズおよび分散を確実にするために安定剤を有し得る。さらに、粒子はモルディ（Molday）への米国特許第4,452,113号で説明された多価により被覆された鉄酸化物粒子のような様々な粒子で被覆され得る。

この発明はさらに、疎水性の粒子、不溶性金属コロイド、脂質溶性ヨウ化化合物またはヨウ素元素がベルフルオロカーボン分子内に含まれるものを含む他のヨウ化化合物の用途を考える。しかしながら、この発明の特に好ましい一実施例において、微粒子はヨウ化されていない。この発明のいくつかの実施例はヨウ化されたフルオロカーボンを利用し得るが、ヨウ化された油および結晶のような非フルオロカーボンヨウ素化合物は除外されることが好ましい。

この発明の方法は造影されるべきリンパ節の近傍での造影剤の間質注射（または他の間質投与）を含む。間質注射は皮下への注射（皮膚の下または中）および実質内注射（器官の中）を含むが、腹腔内注射のように体窩の中への注射は含まない。癌患者の場合には、リンパ節の癌転移は癌の近くに造影剤を注射することによって好ましくは評価される。造影物質はリンパ系によって摂取され、かつ摂取部位へ輸入性のリンパ節に集中する傾向にある。したがって、造影剤は転移腫瘍がリンパ系内でおそらくたどるであろう経路と同一の経路をたどる。

適当な待ち期間の後、通常は2、3時間ないし2、3日後、リンパ節は造影されかつ節のサイズおよび節内解剖学

的構造が可能性ある癌の巻添えを含んでその場所および正常度を決定するために評価される。3日と1カ月との間の待ち時間が好まれ、かつ4日と15日との間の待ち時間は特に好まれる。

この発明はフルオロカーボン乳剤の調製のためのプロセスを開示し、そのプロセスは水相を有しかつフルオロカーボン相を有する水性の乳剤を形成するステップと、透析、限外濾過法または逆浸透によって乳剤を濃縮するための水性相の少なくともいくらかを除去するステップとを含む。そのプロセスの他の変形において、フルオロカーボン相は150ナノメートルより小さい平均粒子サイズを有する。さらに他の変形において、濃縮ステップは透析、限外濾過法または逆浸透を含む。さらに、フルオロカーボン相の少なくとも20容量%は、他の実施例において300ナノメートルより小さい粒子サイズを有し得る。

#### 発明の詳細な説明

この発明を実施する際に使用され得る多数の微粒子造影物質がある。

#### 1. フルオロカーボン乳剤造影剤

造影物質の1つの特に好ましいカテゴリーは乳剤の形状の放射線不透過性のフルオロカーボンを含む。これらの物質は実質的に無毒でありかつ体から非常に容易に排除され得る。我々はリンパ節を造影するために皮下に注射されるためのある範囲の粒子サイズを持ったベルフルオロ臭化オ

より小さい平均粒子サイズを有する好ましくは乳剤の形状である。最も好ましくは、300nmより小さい平均粒子サイズが利用される。

この発明は経皮のリンパ管造影法に適切な放射線不透過性フルオロカーボン乳剤を含み、この乳剤は水性相およびフルオロカーボン相を含み、フルオロカーボン相は上に述べられたような平均粒子サイズを有する粒子を含む。PFOB乳剤が好まれる。さらに、最も好ましいフルオロカーボン乳剤は非常に濃縮されており、かつフルオロカーボンで少なくとも30%、好ましくは35%または40%およびより好ましくは少なくとも50%または55%、w/vのフルオロカーボン濃度を有する。上限において、乳剤は好ましくは多くとも125%フルオロカーボン、w/vを有し、乳剤はいずれかの適切な方法で調製され得るが、好ましい方法は水、フルオロカーボン、界面活性剤およびいずれかの所望の賦形剤の混合物を高圧機械乳化装置の中を通すことを含み、この装置において混合物は高い状態または高い機械応力の状態にさらされる。かかる乳化機は典型的に2000psiないし25,000psiの圧力で動作し、かつ非線形経路に沿って高速で混合物を指向し乳剤を発生する。通常数回の機械の中の通過が均質で安定した乳剤を発生するために使用され得る。適切な乳化装置はマイクロフレイディスク・コーポレーション (Microfluidics Corporation) (ニュートン (Newton)、マサチュー

セツ (Mass.) から市場で入手可能であり、その装置はモデルナンバーM-110である。また使用に適しているものはアルバートランド (Albertslund) (コペンハーゲン (Copenhagen)、デンマーク (Denmark)) からのザ・レーニエ・ホモジナイザー (the Ranie Homogenizer) 12-51と他の高圧バルブホモジナイザーである。

これらの乳剤はしばしば肝臓-脾臓造影のために使用されるものより希薄であるが、より小さい目標組織塊を有する。乳剤の粘性は11.5 sec<sup>-1</sup>のずり速度で測定された25℃での50cpsより好ましくは小さい。もし必要であれば、使用される乳剤の容量は遠心分離のような物理的方法によって乳剤を濃縮することによって減少され得る。乳剤の濃縮はまた逆浸透、透析または限外濾過法、マイクロ濾過法および超遠心分離法を含む他の方法を使用して達成され得る。PFOBに加えて、毒性のないヨウ化フルオロカーボンおよびたとえば米国特許第3,818,229号、3,975,512号および第4,073,819号に開示された臭化ベルフルオロカーボンのような他の放射線不透過性フルオロカーボンが利用され得る。ヨウ化フルオロカーボンは一、二、または三ヨウ化ベルフルオロカーボンであり得る。この発明のフルオロカーボンを使用した実施例において、フルオロカーボンは5から900nm、および好ましくは500nm

セット (Mass.) から市場で入手可能であり、その装置はモデルナンバーM-110である。また使用に適しているものはアルバートランド (Albertslund) (コペンハーゲン (Copenhagen)、デンマーク (Denmark)) からのザ・レーニエ・ホモジナイザー (the Ranie Homogenizer) 12-51と他の高圧バルブホモジナイザーである。

粒子サイズおよび流動学的特性を制御するために、我々はフルオロカーボン相の初期濃度が重要であることに気がついた。最適の特性は20%と40%、w/vとの間のフルオロカーボン濃度で発生されるように思われ、30%乳剤は我々の研究においてよい結果を与え、平均粒子サイズ500nm以下でかつ25℃で測定された11.5 sec<sup>-1</sup>のずり速度で50cpsより小さい粘性を有する乳剤を形成した。乳剤の形成後、それを蒸気オートクレーブで滅菌することが有利である。適切な滅菌パラメータは約110℃で15分間の滅菌を含む。滅菌の前後のいずれかで、乳剤は患者へ投与される物質の容量を最小限にするために濃縮され得る。

濃縮は透析、限外濾過法、逆浸透などによって達成され得る。特に、DDSマイクロ濾過 (ナノ濾過) 膜GRM1, 0PP (ニロ・アトマイザー・フード&デイルー・インコーポレーテッド (Niro Atomizer Food & Dairy Inc.)、ハドソン (Hudson)、WI) は、ポリスルホンからなりかつ1ミクロン (μ) の分子重量カットオフを有し、—1 μ

は10ミリオンの分子重量に等価であるが、この膜が利用され、また0.2 $\mu$ の分子重量カットオフを有するDDSマイクロ濾過膜GRM0.2PPまたは0.1 $\mu$ の分子重量カットオフを有するGRM0.1PPも効果的である。代替的にもし限外濾過法が使用されれば、最も効果的な膜は500.000(0.05 $\mu$ )の分子重量カットオフを有するDDSポリスルホン限外濾過膜CR10PPである。前述の膜のすべては0℃から75℃の範囲の温度でかつ1から13の範囲のpHで使用可能である。もし限外濾過法が選択されたプロセスであれば、平方インチにつき(psi)約 $\leq 100$ ポンドが適切である。もしナノ濾過が利用されれば、100-400psiが使用され、一方約600psiが逆浸透に適切である。

## 2. 他の放射性無透過性造影剤

放射線不透過性フルオロカーボン乳剤に加えて、他の放射線不透過性物質がこの発明の実施に使用され得るが、それらが要求された粒子サイズ特性、適切な流動性および適当な安全性を有する注射可能な物質の形状である限りにおいてである。

ヨウ化物質はコンピュータ断層撮影およびX線処置で造影剤として長く使用されてきた。たとえば先行技術においてヨウ化された多数の水不溶性有機化合物がある。たとえばけし種子油脂肪酸のエチルエステルのヨウ化オイルはリンパ管造影で現在使用されている。米国特許第4,404,182

代替的に、他の造影剤が前述の物質から必須のサイズを有する粒子を形成するために使用され得る。デキストラン、アルブミン、ラテックス、ポリスチレンおよび他の蛋白質、合成ポリマーなどが上述のサイズ特性を有する粒子で入手されることは周知である。必要な粒子サイズを有するリポソームもまた従来の技術を使って形成され得る。これらの粒子はそれ自体造影用途には一般に適さないが、それらは造影可能な物質と組合わせてこの発明で使用され得る。したがって、たとえば、放射線造影物質のミクロン以下の粒子は既知の方法を使用してこれらの微粒子化合物に結合され、それによって被包されまたは物理的にそれらに組込まれることが可能である。使用前に、それらはリン酸緩衝塩類液のような適切な注射可能な担体の中で、選択的に周知の生理学的に受入れ可能な界面活性剤のいずれかと組合わせて好ましくは懸濁される。保存剤および抗菌剤もまた従来の濃度で使用され得る。

## 3. MRI造影剤

前述の放射線造影物質はリンパ系のコンピュータ断層撮影およびX線造影のために使用され得るが、MRI造影剤もまたこの発明の実施に望ましい。MRIは従来の放射線学および放射線断層に比べてリンパ節が脂肪組織のそれと比較してそのプロトンのスピン緩和において固有の違いを有するという点においていくつかの技術的に有利な点を有するが、しかしながら節内にはほとんど組織のコントラ

スはその乳剤を含むけし種子油脂肪酸のエチルエステルのヨウ化オイルベースの造影剤を開示する。その特許の乳剤は2-3ミクロンの粒子サイズを有するが、上述のものに類似の乳化法はこの発明で使用するために適切に小さい粒子サイズを有する乳剤を形成するために使用することが可能であった。

けし油と他の油とのヨウ化脂肪酸エステルは現在リンパ管造影に使用されている。これらの物質は必須の粒子サイズを有する乳剤に処方された場合この発明の実施に使用されることが可能である。さらに他のヨウ化された脂質物質または対応する臭化された物質はこの発明の実施に同様地使用され得る。何らかの毒性がこれらの物質に対して報告されているので、したがってより毒性の少ない造影剤が好まれる。しかしながら、経皮のリンパ管造影を実施する際にこれらのすでに承認された物質を使用することはこの発明の範囲内と考えられる。

ヨウ化されたまたは臭化された物質に加えて、多くの他の電子が密集した物質がこの発明で使用され得る。電子密度は金または鉄、クロム、ガドリニウム、イットリウム、ジルコニウム、ハフニウム、鉛またはアンチモン、酸化物、リン酸塩、硫化物または硫酸塩および他の非放射性金属のような非放射性元素または化合物によって与えられ得る。前述のものはコロイドまたは適当なサイズの粒子の形状で有利に利用され得る。

トはなく、したがって節拡大はMRIが使用される場合には異常の唯一の利用可能な基準である。

「T1」および「T2」という言葉は一般にプロトンのスピン緩和時間をいう技術用語である。プロトンのスピン密度および緩和時間は本質的にプロトンMRIが検出するものである。脂質組織は他の組織に対して短いT1および長いT2を有するので、選択的にT2を短くする超常磁性または強磁性のクラスの造影剤が好まれる。最適のサイズの超常磁性粒子は皮下または実質内に投与されてリンパ節のいずれかの所望の鎖を引き立たせ得る。かかる粒子を単一クローン抗体で被覆して興味あるリンパ節または他の組織内にある程度の細胞特異性を与えることも可能である。デキストラン被覆はまた凝集を低減させるためにも使用され得る。

固有の組織コントラストがMRIの主要な強みであるが、いくつかの組織対は固有のコントラストに欠け、かつ組織の特異性および機能的特性のどちらもが最適状態には及ばない。したがって造影剤はいくつかの臨床応用のためにMRIを改善する可能性を有する。特に、それらはこの発明に従ってリンパ系を造影する際に有利であるように使用され得る。

造影剤には2つの主要なクラス、つまり常磁性および超常磁性がある。常磁性造影剤は対になっていない電子スピンを有し、このスピンはそれらに密に接近し得る(1nm



以内) 核、通常は水プロトンの緩和を容易にする。これらの造影剤はT1およびT2の双方を減少させ、 $\mu M$ 濃度で効果的であり、かつ好ましい生体分布および毒性プロファイルを有するキレート化合物に組込まれ得る。シェーリング (Schering) の特許された製品GdDTPA (ガドリウムジエチレントリアミン五酢酸) は、いくつかの市場で入手可能なかかる造影剤の優れた例である。リンパ管造影に使用するために、このクラスの造影剤は体循環による取込みを回避するために高分子に組込まなければならない。アルブミン、適当なサイズの他の生物学的分子、ラテックス、デキストラン、ポリスチレンまたは他の毒性のない自然または合成ポリマー、もしくはリポソームの被包との組み合わせは前述のように達成され得る。

これはこの発明の1つの重要な局面を表わすけれども、超常磁性または強磁性クラスを好むには少なくとも2つの理由がある。まず、リンパ節のサイズを検出するために、節を取囲む脂質が節自体に貴重なコントラストを与える。リンパ節内の強磁性の存在は原則的にはT1を低減し、かつリンパ節を周りの脂質とより等強度にするのでゆえに識別をより困難にさせるであろう。これはサブトラクション方を用いて克服され得るが、間質貯溜場所からのリンパ節の取込みは2-72時間に渡って発生し、かつこれが2cmより小さい構造の正確な修復 (サブトラクションのための) をいくぶん困難にさせる。第2に、磁石内に超常磁性また

は強磁性フィールドを作り出す対になっていないスピンのクラスタははるかに効きかつ選択的にT2を減少させる。リンパ節はすでに脂質より短いT2を有するので、超常磁性造影剤は脂質に対する組織コントラストを増加させるであろう。

同じく重要なのはリンパ節目標に要求される造影剤の物理的サイズが多くの適切な超常磁性造影剤と同一のサイズ領域に実質的にあるという事実である。これは超常磁性フュライトおよび磁鉄鉱の粒子にあてはまる。最後に、超常磁性はすべてのフィールドでかつほとんどすべてのパルス系列とともに効果的であり、ゆえに臨床環境でのそれらの究極的な使用を容易にする。

幸いに、ここに論じられた造影剤の多くは多様な造影で使用され得る。たとえば、MRI造影剤は通常は電子密集物質でもあるので、ゆえにMRIと同様にCTまたはX線造影の双方にも使用され得る。PFOB乳剤はまたMRIにとって極めて有用である。さらに、フルオロカーボン乳剤、磁鉄鉱懸濁液などのような前述の物質の多くは超音波造影物質としても同様に使用され得る。

可能性のある造影剤の中で、我々のデータは他に比べて以下の造影剤が効果的であることを示している：

1. CTおよびデジタルX線にとっては：PFOB乳剤；けし種子油脂肪酸のエチルエステルのヨウ化オイルもしくは他のヨウ化されたまたはハロゲン化された親油性物

質の乳剤：

2. 超音波にとっては：PFOB乳剤、磁鉄鉱懸濁液、他の重いまたは空気閉込め製品。

3. MRIにとっては：PFOB乳剤、ジルコニウム二酸化物コロイドまたは $Gd_2O_3$ コロイドのような金属二酸化物コロイド、常磁性高分子、超磁性または強磁性粒子、他の類似の乳剤および封じ込められた物質を有する小さなリポソーム。

#### 4. 経皮リンパ管造影を行なうための方法

この発明の方法は明瞭である。要約すると、前述のようにまたは以下の例のように調製された造影可能な量の適切な造影剤は造影されるべき動物に間質に (皮下にまたは実質に) 注射される。十分な時間が経過して動物のリンパ系への造影剤の集を許容した後、従来の造影工程が行なわれる。

リンパ系への造影剤の優先的な取込みのために、比較的小ない量の造影剤が必要とされる。たとえば、CTおよび超音波を使って人間の頸のリンパ節を造影するために、約1-5ccの30%w/v PFOB乳剤が目標節に排出するリンパ管支流の近傍に、好ましくは耳の前もしくは後または既知の腫瘍の部位に皮下に注射される。同様に、0.1-0.5Mの濃度でリン酸緩衝塩類液で懸濁された約1-2ccの $Gd_2O_3$ マイクロコロイドが同じ領域のMR造影のために使用され得る。双方の場合において、注射と

造影との間の時間の量は約1/2時間と72時間との間であり、好ましくは24と48時間との間である。

同様に検出可能な量の他の造影剤は前述の情報を参照することによって当業者には容易に決定可能であろう。さらに、例で報告された型のウサギでの簡単な希釈と時間の研究は他の造影剤および/または造影方法体系のための適切な量を容易に決定するために使用され得る。

この発明は新生物または他の病気の検出のためにリンパ節を造影するのに特に適切である。我々は領域毎にこれらの物質の取込みに何らかの変化があることに気がついた。ウサギでは、たとえば、最大の取込みは前肢から腋窩の節にかけてでありそれに続いて後肢から膝窩の節へ、ほおから頸の節へ、胸から腋窩の節へおよび大腿から鼠径の節へという順である。

したがって、人間では、手または腕への注射は腋窩節を造影するために使用され、足または脚への注射は膝窩節を造影するために使用され、ほおまたは顔への注射は頸節を造影するために使用され、および大腿への注射は鼠径節を造影するために使用される。

#### 5. 経皮のリンパ管造影のための薬物の調製

この発明はまた人間または他の哺乳類の体に間接または皮下リンパ管造影を行なう際に使用するための薬物を調製する際にここに説明された微粒子物質を使用することも含む。薬物はたとえば、造影粒子を従来の組成物の薬剤的に

受入れ可能な注射可能な担体の中で懸濁することによって調製され得る。担体は、乳剤の場合には、乳剤の水相である。適切な浸透性かつ緩衝造影剤は薬剤分野において通常である処方で使用され得る。薬物は好ましくは間質投与によって間接リンパ管造影のために使用され、1カ月以下で造影されることを示す指示または文書とともに好ましくは包装される。また、薬物はこの処方の間接リンパ管造影のために人間に使用するための政府の正規の認可を受けたことを表わす表示のついた容器に包装され得る。かかる認可は合衆国で販売される薬物に対して米商食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration) からたとえば入手される。

この発明の特定の実施例は、代表するものであって制限するものではない以下の例を参照することによって容易に理解され得る。

#### 例 1

##### ベルフルオロカーボン乳剤の調製および凝集

適当な粒子サイズおよび流動学的特性を有する乳剤は以下のものを含む混合物を形成することによって調製された：

成分	パーセント (w/v)
ベルフルオロ臭化オクチル	30
卵黄リン脂質	6
マンニトール (Mannitol), USP	0.4
塩化ナトリウム	0.5

用された。

この例の乳剤はもし望まれればより高い濃度乳剤を形成するために濃縮されることが可能である。濃縮は透析、限外濾過法、ナノ濾過法、逆浸透などによって達成される。たとえば、一実施例はDDSマイクロ濾過 (ナノ濾過) 膜 GRM1.0PP (ニロ・アトマイザー・フード&デイル・インコーポレーテッド、ハドソン、WI) を使用し、この膜はポリスルホンからなり、かつ1ミクロン ( $\mu$ ) の分子重量カットオフを有するが、0.2  $\mu$  の分子重量カットオフを有するDDSマイクロ濾過膜 GRM0.2PP または 0.1  $\mu$  の分子重量カットオフを有する GRM0.1PP もまた効果的に使用され得る。他の好ましい実施例は濃縮方法として限外濾過法を使用する。かかる応用で最も効果的な膜は500,000 (0.05  $\mu$ ) の分子重量カットオフを有するDDSポリスルホン限外濾過膜 CR10PP である。前述の膜のすべては0℃から75℃の範囲にわたる温度でかつ1-13の範囲にわたる pH で使用可能である。もし限外濾過法が選択されたプロセスであれば、平方インチにつき (psi) 約100ポンドが適当である。もしナノ濾過法が使用されれば、100-400 psi が使用され得るが、一方で約600 psi は逆浸透にとって適当である。

代替的に、より高い濃度の乳剤はPFOB濃度を増加させながらこの例の手順を使って最初から調製され得る。リ

エデト酸カルシウム二ナトリウム 0.015

d- $\alpha$ -トコフェロールアセテート 0.05

凝縮の前に pH 8.2 に緩衝

この混合物は15,000 psi の圧力で高圧機械乳化機 (モデル M-110、マイクロフルイディクス・コーポレーション (Microfluidics Corporation)、ニュートン (Newton)、マサチューセッツ (Mass.)) の中で5回通された。結果として生じる乳剤は最後に121℃で15分間安定化された。安定化された乳剤は53%のPFOB粒子200 nmより小さくし、3.4%のPFOB粒子を500 nmより大きくした状態で190 nmの中間の粒子サイズ直径を有した。25℃でのこの調整物の粘性は11.5 sec<sup>-1</sup>のずり速度で3.4 cpsでありかつ46 sec<sup>-1</sup>のずり速度で3.0 cpsであった。

同一の製剤を使用して、粒子サイズ分布は乳化装置の間の通過の回数を変えることによって修正されて以下の乳剤 A-D を与えた：

バッチ	平均直径 nm	容量百分 %	
		<200 nm	>500 nm
1	200 ± 90	61.4	2.0
2	210 ± 100	54.6	2.0
3	180 ± 80	73.0	0.5
4	310 ± 210	40.0	36.0

これらの乳剤は下の例 1.1 のデータを生み出す際に使

ン脂質乳化剤の減少はPFOBのより高い濃度 (たとえば75% PFOB 乳剤に対して4.5%のリン脂質) で望ましいかもしれない。

#### 例 1.1

##### MRI 造影剤の調製

磁鉄磁球はアドバンスト・マグネティクス・インコーポレーテッド (Advanced Magnetics, Inc.) (ボストン (Boston), MA) からの500 nmの平均粒子サイズを有するバイオマッグ (Biomag) M4125で入手された。(磁鉄磁球のための他の市販されているソースはイミニコン (Immunicon) (ハンチントン・バレー (Huntington Valley), PA) である。代替的に、微粒子はエルモア (Elmore), W. C., Phys. Rev. 54: 頁309-310 (1939年) またはマクナブ (McNab)、他、J. Appl. Physics 39: 頁5103-5111 (1968年) で説明された手順によって調製される。加えて、我々はデキストランで被覆された粒子および血漿アルブミンで被覆された粒子を調製して凝集を低減しかつリンパ管の取込みを容易にした。被覆された粒子は一般にモルデイ (Molday)、他、J. Immunol. Meth. 52: 頁353-367 (1982年) によって述べられたように一般に調製される。GdDTPAはDTPAの二無水物を使ってナトウィッチ・アンド・シーゲル (Natowitz and Siegel)、Science 220: 頁613-615 (1983年) に説明された手順によって60,000 mw デキストランに結合された。

## 例 I I I

## P F O B を使ったウサギの経皮リンパ管造影

## A. プロトコル 1

各々約 2-2.5 kg の重量のある生体雄 NZW ウサギは様々な時間間隔で例 1 の 30% w/v P F O B 乳剤 (第 1 の製剤) と 0.6 gm/注射部位投与量を使って皮下に P F O B 乳剤を与えられた。以下の表はこれらの様々な時間間隔での P F O B の濃度の平均および標準偏差値 (mg P F O B/gm 組織) を表わす:

時間間隔	サンプル	平均	標準偏差	サンプル数
24時間	頸 <sup>1</sup>	9.20	4.74	11
	腋窩 <sup>2</sup>	27.35	12.57	11
	鼠径 <sup>3</sup>	6.20	6.63	11
	膝窩 <sup>4</sup>	16.57	4.51	11
48時間	頸	17.72	10.46	3
	腋窩	39.46	27.16	3
	鼠径	6.09	6.47	3
	膝窩	27.73	9.35	3
72時間	頸	10.69	14.73	9
	腋窩	75.34	23.39	9
	鼠径	6.82	9.19	9
	膝窩	39.09	14.89	9
1週間	頸	19.90	14.51	12
	腋窩	86.78	37.68	12

各ラビットは 1 回だけ造影されてそれから検体された。腋窩節は取除かれ、かつ P F O B 濃度はガスクロマトグラフィによって測定された。強調された節のピークの CT 強度とリンパ節 P F O B 含有量との間の相関関係は非常に大きかった (ハウズフィールドユニットに対して  $R=0.82$ 、オブティマスユニットに対して  $R=0.79$ )。前足への注射の後の造影間隔は 3 日 ( $n=20$ ): 7 日 ( $n+12$ ): 10 日 ( $n=7$ ): および 12 日 ( $n=13$ ) であった。4 つの時間期間すべてで、各 30% 乳剤は目標節の首尾一貫しかつ密な混濁化を示した。ピークの混濁化は 10 日で見られたが、すべての時間期間は臨床診断にとって十分な強調を有する正常な節内構造を識別すると判断された。

血液化学、リンパ節および注射部位の組織学並びに何週間にもわたるラビットのおよび何ヶ月にもわたるサル臨床追跡調査は局所的または全身毒性の証拠を何も示さなかった。

これらの乳剤のすべては間接リンパ管造影で効果を示した。

## C. プロトコル 3

30% P F O B 乳剤を使った経皮リンパ管造影は各々 6-25 lbs. の重量がある六 (6) マカークザル (Macaque) で行なわれた。1.0 cc の乳剤が左足の足指の水掻き部分に注射された。3 日、7 日および 17 日後に、左

	鼠径	3.59	4.77	11
	膝窩	47.28	19.60	12
2 週間	頸	9.34	7.74	6
	腋窩	55.39	19.88	6
	鼠径	5.03	5.24	6
	膝窩	27.12	10.82	6
1 カ月	頸	11.82	5.53	8
	腋窩	46.86	6.79	8
	鼠径	0.64	0.27	4
	膝窩	20.85	3.42	8

1 注射部位: ほお 2 注射部位: 前足

3 注射部位: 大腿 4 注射部位: 後足

## B. プロトコル 2

P F O B を使用する間接リンパ管造影の効力を示すために、4 つの別個の 30% 乳剤が調製されかつ各前足に 0.3 gm の投与量でウサギに投与された。(これらは例 1 の乳剤 A-D である。) 各ラビットは薄断面隣接スライス法を使って CT によって造影され、腋窩節の放射線不透過性を識別しかつ量を計られた。節強度を測定する 2 つの異なる方法はすばらしい相関関係を示した (ハウズフィールド (Hounsfield) ユニットで表わされた CT コンソール、任意のユニットで表わされたゼーナス (Zenith) のワークステーションでのオブティマス (Optimas) ソフトウェア、 $R=0.99$ )。

の鼠径節が 6 匹すべてのサルで薄スライス CT 造影上で容易に可視化された。これらの動物は 1 年以上の間臨床的に追跡調査されたが、注射部位または一般的な健康状態に明らかな何ら都合の悪い影響もなかった。

## 例 V I

リンパ節のより大きい粒子との混濁化の悪い結果を示すために、932 nm の平均粒子サイズを有する  $0.2 \text{ Gd}_2\text{O}_3$  のコロイド懸濁液がウサギのほおおよび胸骨に皮下に注射された。これらのウサギは 30-60 日にわたって連続的に造影された。注射部位は CT スキャン上で密に混濁化されたが、いずれのウサギにもリンパ節混濁化は何も得られなかった。放射線不透過性コロイド粒子のデキストランとの希釈および被覆 (2 つの付加的注射) は注射部位またはリンパ節混濁化からの探知できる吸収にはつながらなかった。

## 例 V

## ガドリニウム造影剤を使った MR 造影

60.000 mw デキストランと結合された  $\text{Gd-DTPA}$  (例 I I から) は墨と共に 20 匹のネズミに皮下に投与されてリンパ節が見えるように印を付けられた。ネズミは 24 時間後に検体されてそのリンパ節は  $\text{Gd}$ -高分子の特徴的な高フィールドピークを示した。ネズミのリンパ節はあまりに小さいので我々のシグナ (Signal) システムを使って造影することはできない。

## 例V

## 超常磁性磁鉄鉱粒子を使ったMR造影

磁鉄鉱は不適合に隣接プロトンのT2緩和を減少する。初期にエーテル麻酔をかけられたネズミは各足で0.1m1(1mg鉄)の磁鉄鉱球(例11から)を摂取した。各グループの12-16匹のネズミが検体されてそのリンパ節が生体外における緩和時間の測定値で検査された。そのリンパ節のT2は以下のものであった:

	コントロール	3時間	6時間	12時間	24時間
T2(平均)	55	61	58	39	29

比較的ゆっくりした取込みは粒子が凝集することが可能であることおよび/または麻酔の後の不活性がリンパ管吸収を遅らせていることを示した。この理由のために、1%デキストランが凝集を低減するために加えられ、他のネズミは強制された水泳によって15分間運動させられて3時間後に検体された。その結果は以下に示される。

	磁鉄鉱	磁鉄鉱	磁鉄鉱	磁鉄鉱
	デキストランなし	水泳なし	+デキストラン	+デキストラン
				+水泳
T2(平均)	48	43	33	22

この発明を特定の実施例に関して説明してきたが、この特許の包含する範囲はそれらの特定の実施例に制限されるものではなく以下の請求の範囲を参照して決定されることが意図されるものである。

## 請求の範囲

1. 微粒子またはコロイド形状の診断上効果的な量の非放射性造影剤を含む組成物であって、造影剤が集中したリンパ系組織の造影を可能にして経皮リンパ管造影を行なうため、造影剤が間質的に投与された部位に輸入性のリンパ系組織に集中することが可能な造影剤の調製において、粒子の平均サイズが直径で5から900ナノメートルである、組成物。
2. 少なくとも80%(容積で)の前記粒子は直径で10と500ナノメートルとの間である、請求項1に記載の組成物。
3. 少なくとも20%の粒子は直径で200ナノメートルまたはそれ以下である、請求項1に記載の組成物。
4. 粒子は超常磁性もしくは強磁性であり、または不溶性金属コロイド、脂質水溶性ヨウ化された化合物または造影可能なフルオロカーボンを含む、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。
5. 造影剤は一臭化ベルフルオロカーボンのような臭化されたベルフルオロカーボンである、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。
6. 造影剤はベルフルオロ臭化オクチルである、請求項1ないし3および5のいずれかに記載の組成物。
7. 造影剤は一、二または三ヨウ化ベルフルオロカーボンである、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。

## 特許庁長官殿

1. 事件の表示  
国際出願番号: PCT/US90/02984
2. 発明の名称  
経皮のリンパ管造影
3. 特許出願人  
住 所 アメリカ合衆国、92121 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、サイエンス・パーク・ロード、3040  
名 称 アライアンス・ファーマス्यूティカル・コーポレーション(ほか1名)  
代表者 不詳  
国 籍 アメリカ合衆国
4. 代理人  
住 所 大阪市北区南森町2丁目1番29号 住友銀行南森町ビル  
電話 大阪(06)361-2021  
氏 名 弁理士 (6474) 深見 久 郎
5. 補正書の提出年月日  
1991年 7月 1日
6. 添付書類の目録  
補正書の写し(翻訳文)

1通



8. 粒子の平均サイズは300nmより小さい、請求項1ないし7のいずれかに記載の組成物。
9. 粒子は造影可能な成分と造影可能な成分を組込む適当にサイズ決めされた微粒子担体とを含む、請求項1に記載の組成物。
10. 組成物は造影剤が間質的に投与された部位に輸入性のリンパ系システム組織に集中するように適合されて造影剤が集中したリンパ系組織の造影を可能にするように経皮リンパ管造影を行なう、請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物の用途。
11. 造影はMRI、超音波、X線、デジタルサブトラクション法またはコンピューター断層撮影法によって行なわれる、請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物の用途。
12. 間質投与の部位は手、足、または腕を含み、膝窩、膝窩または舌の下の造影を許容する、請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物の用途。
13. フルオロカーボン乳剤の調製のためのプロセスであって、

水性相を有しかつフルオロカーボン相を有する水性乳剤を形成するステップと、さらに

水性相の少なくとも幾分かを除去して透析、限外濾過法または逆浸透によって乳剤を濃縮するステップとを含む、

特表平4-506078 (13)

プロセス。

14. フルオロカーボン相は150ナノメートルより小さい平均粒子サイズを有する、請求項13に記載のプロセス。

15. 前記濃縮するステップは透析、限外濾過または逆浸透を含む、請求項13に記載のプロセス。

16. 少なくとも20容量パーセントの前記フルオロカーボン相は300ナノメートルより小さい粒子サイズを有する、請求項13に記載のプロセス。

17. 5ナノメートルと900ナノメートルとの間の平均粒子サイズを有する造影可能な微粒子物質の間接リンパ管造影を行なうために哺乳類への間質投与のための造影剤として使用する薬物の調製における用途。

18. 間接リンパ管造影を行なうために哺乳類に間質的に投与するための造影剤として使用するための薬剤的組成物の形状にある請求項1ないし9のいずれか1つに記載の組成物であって、

注射に適切な薬剤的に受入れ可能な恒体中で5ナノメートルと900ナノメートルとの間の平均粒子サイズを有し、かつ前記組成物の投与部位に輸入性のリンパ系組織に集中するように適合された微粒子またはコロイド形状の造影可能な非放射性造影剤によって特徴づけられる、組成物。

19. 間接リンパ管造影のための造影剤として前記微粒子物質の間質投与に対する政府の承認を表わす印を付けた

前記微粒子物質に関連した包装材料をさらに含む、請求項 18 に記載の組成物。

20. 間接リンパ管造形を行なうための方法であって、請求項1に記載の組成物を間質的に投与するステップと、造形剤が注射部位に輸入性のリンパ系組織に集中することを可能にするステップと、さらに

前記造影剤が前記投与の約1カ月以内に集中したリンパ系組織を造影するステップとを含む、方法。

## 國際調查報告

[illegible]

第1頁の続き

優先権主張 ②1990年5月29日③米国(U S )④530,034

⑦発 明 者 ロング, デイビッド・エム アメリカ合衆国、92020 カリフォルニア州、エル・カホン、ホ  
ライズン・ヒルズ・ドライブ、10988

⑧出 願 人 ウルフ, ジェラルド・エル アメリカ合衆国、08190 マサチューセッツ州、ウインチエスタ  
ー、ホーソーン・ロード、5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**